



## Биотехнологический потенциал холодоактивных ферментов в промышленности: обзор последних достижений

Д.Д. Белова<sup>✉</sup>, Н.Ю. Шарова

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок –  
филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Аннотация.** Психрофильные/психротрофные микроорганизмы широко распространены по всему миру и встречаются в глубинах морей, озерах и океанов, ледниках, полярных регионах, льдах Арктики, вершинах горных массивов, пещерах. Они способны выживать в холодном климате и экспрессируют адаптированные к холоду ферменты, наделенные уникальными катализитическими свойствами по сравнению с их мезофильными и термофильными аналогами. Холодоактивные ферменты обладают более высокой катализитической активностью при низких температурах, термолабильностью и структурной гибкостью активных центров. Благодаря данным характеристикам эти ферменты становятся все более привлекательными для промышленного применения, поскольку они могут снизить энергетические затраты на проведение реакции, сократить количество побочных реакций и достаточно просто инактивируются. Кроме того, повышенная структурная гибкость может привести к широкой субстратной специфичности, что расширяет сферу их применения. Из-за относительной простоты крупномасштабного производства по сравнению с ферментами растительного и животного происхождения коммерческое использование микробных ферментов становится все более привлекательным. Рынок ферментов стремительно развивается. Холодоактивные ферменты могут использоваться в различных биотехнологических и промышленных процессах, включая молекулярную биологию, биотрансформацию, производство моющих средств, продуктов питания и напитков, текстильную промышленность, очистку сточных вод, производство биоцеллюлозы, биоремедиацию окружающей среды в холодном климате и др. Генетически модифицированные штаммы, производящие определенные виды холодоактивных ферментов, представляют особый интерес для различных биотехнологических процессов. В данной статье представлен обзор нескольких последних работ в области получения холодоактивных ферментов микробного происхождения и их применения.

**Ключевые слова:** холодоактивные ферменты, психрофильные микроорганизмы, аргиназы, лактазы, ксиланазы, протеазы, липазы, амилазы

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН» по теме FGUS-2022-0003.

**Для цитирования:** Белова Д.Д., Шарова Н.Ю. Биотехнологический потенциал холодоактивных ферментов в промышленности: обзор последних достижений // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. № 4. С. 465–475. DOI: 10.21285/achb.1004. EDN: AEBKRQ.

## Biotechnological potential of cold-active enzymes in industry: A review of recent progress

Daria D. Belova<sup>✉</sup>, Natalya Yu. Sharova

All-Russian Research Institute of Food Additives – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbatov, Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms are widespread throughout the world and found in the depths of seas, lakes, and oceans, as well as in glaciers, polar regions, Arctic ice, caves, and on mountain peaks. Unlike their mesophilic and thermophilic counterparts, these microorganisms can survive in cold climates by expressing cold-adapted enzymes that have unique catalytic properties. Cold-active enzymes exhibit higher catalytic activity at low temperatures, structural flexibility of active sites, and thermolability. Due to the specified characteristics, these enzymes are becoming increasingly attractive for industrial use, as they can lower the energy costs of the reaction, decrease the number of side reactions, and are relatively easy to inactivate. In addition, increased structural flexibility can lead to broad substrate specificity, which expands their scope of application. Due to the relative simplicity of large-scale production (as compared to that of plant and animal enzymes), microbial enzymes are becoming increasingly attractive for commercial use, which contributes to the rapid development of the enzyme market. Cold-active enzymes can be used in various biotechnological and industrial processes: molecular biology, biotransformation, detergent production, food and beverage production, the textile industry, wastewater treatment, biocellulose production, environmental bioremediation in cold climates, etc. Of particular interest for various biotechnological processes are genetically modified strains producing certain types of cold-active enzymes. This article provides a review of several recent studies on the production of cold-active microbial enzymes and their application.

**Keywords:** cold-active enzymes, psychrophilic microorganisms, arginases, lactases, xylanases, proteases, lipases, amylases

**Funding.** The work was carried out within the framework of the state assignment of the All-Russian Research Institute of Food Additives – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbatov, Russian Academy of Science (topic FGUS-2022-0003).

**For citation:** Belova D.D., Sharova N.Yu. Biotechnological potential of cold-active enzymes in industry: A review of recent progress. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(4):465-475. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.1004. EDN: AEBKRQ.

### ВВЕДЕНИЕ

Холодные среды представляют собой большую часть биосфера Земли и включают в себя глубоководные моря, океаны, озера, ледники, горные вершины, арктические и высокогорные почвы, пещеры и др. Микроорганизмы (бактерии, археи, простейшие, одноклеточные водоросли и грибы), населяющие эти среды обитания, в процессе своего существования выработали несколько физиологических и молекулярных механизмов, чтобы приспособиться для жизни в данных условиях. Среди микроорганизмов, способных к росту при низких температурах, выделяют психрофилов (холодолюбивые микроорганизмы, которые развиваются при температуре около 15 °C и ниже) и психротрофов (холодоустойчивые микроорганизмы, которые выживают при температурах ниже 0 °C, но оптимально растут при 20–25 °C) [1–3]. Все внутриклеточные компоненты психрофильных бактерий организованы таким образом, что могут функционировать при низких температурах, а белки-антифризы помогают избегать образования кристаллов льда. Длительный процесс адаптации микро-

организмов к новым условиям существования влечет за собой изменения в геноме, которые, в свою очередь, приводят к производству ферментов, активных при низких температурах [4–6].

Холодаактивные ферменты обладают высокой катализитической активностью при температурах ниже 25 °C и часто более термолабильны по сравнению с их мезофильными и термофильными аналогами. Эти свойства не только предотвращают реакции распада соединений при более высоких температурах, но и обеспечивают мягкий способ их селективной термической инактивации из-за низкой термической стабильности, что особенно важно для процессов с термолабильными субстратами или продуктами. Кроме того, способность холодаактивных ферментов катализировать реакции при низких температурах помогает снизить воздействие на окружающую среду и энергопотребление процесса по сравнению с ферментами, адаптированными к высоким температурам [1, 7–9]. Холодаактивные ферменты сохраняют свою катализитическую активность в органических растворителях, поскольку имеют плотную гидратную об-

лочку. Также среди них встречаются солеустойчивые ферменты [10].

Способность психрофильных ферментов проявлять каталитическую активность при низких температурах обусловлена их структурной гибкостью. Третичная структура каждого белка характеризуется сочетанием элементов вторичной структуры ( $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -тяжей), а также гибких участков полипептидной цепи, называемых петлями. Гибкие участки имеют решающее значение для распознавания макромолекулярных взаимодействий и изменения кинетики связывания и сродства [4, 11]. Также на структурную гибкость белка оказывают влияние особый аминокислотный состав (низкое содержание пролина, аргинина и повышенное содержание глицина), ослабление внутримолекулярных связей (водородных связей, ароматических, электростатических и солевых мостиков), уменьшение компактности гидрофобного ядра, увеличение количества гидрофобных боковых цепей, подверженных воздействию растворителя, более длинные и гидрофильные петли и снижение сродства к связыванию металлов [1, 10, 12]. У некоторых холодаактивных ферментов четвертичная структура образована меньшим количеством протомеров (т.е. более низким состоянием олигомеризации) по сравнению с мезофильными и термофильными аналогами [13]. Однако в других случаях было обнаружено, что более высокое состояние олигомеризации способствует гибкости и активности при низких температурах [14–16]. Холодовая активность не подразумевает наличия всех этих механизмов, достаточно одного или нескольких из них, отобранных в процессе эволюции [10, 12].

Благодаря своим свойствам холодаактивные ферменты востребованы во многих отраслях пищевой, текстильной, фармацевтической и медицинской промышленностей, находят применение при производстве моющих средств, в процессах биоремедиации, молекулярной биологии и др. [1, 4, 7, 17].

На протяжении последних нескольких десятилетий предметом исследований научных сообществ являлись ферменты, проявляющие активность при низких температурах. Эти ферменты обладают значительным технологическим потенциалом и могут найти применение в различных биотехнологических процессах. Целью данного обзора является анализ недавних работ по выделению холодаактивных ферментов микробного происхождения и изучению областей их применения.

## АРГИНАЗЫ

Аргиназы являются важными ферментами в регуляции метаболизма аргинина, выработке оксида азота и опосредовании сигнальных путей, участвующих в цикле мочевины. Кроме того, регуляция и экспрессия L-аргиназы связана со многими патологическими заболеваниями, включая заболевания сердечно-сосудистой, центральной нервной системы, почек, иммунной системы, а также рак. L-аргиназы (L-аргинин-амидиногидролаза, КФ 3.5.3.1) катализируют гидролиз L-аргинина до L-орнитина и мочевины. Этот катализ необходим в цикле образования мочевины для удаления токсичного аммиака и пролиферации клеток во всех живых организмах [18–20].

В работе [21] описана холодаактивная аргиназа (GaArg), синтезируемая психрофильными дрожжами *Glaciozyma antarctica* PI12, выделенными на территории

Антарктиды. GaArg является первой зарегистрированной аргиназой, которая активна при низких температурах, чему способствуют ее уникальные структурные характеристики. Данный фермент катализирует гидролиз L-аргинина при 20 °C и pH 9,0, что на 10–15 °C ниже, чем у других известных мезофильных аргиназ. GaArg в 2–3 раза выше по сродству к субстрату и каталитической эффективности, хотя и с аналогичным оптимумом pH и предпочтениями ионов металлов (кроме K<sup>+</sup>) по сравнению с другими известными аргиназами. Это первый зарегистрированный случай, когда K<sup>+</sup> служит в качестве ионов металла для аргиназы. GaArg имеет общую трехмерную структурную модель, схожую с другими известными аргиназами, но состоит преимущественно из более мелких и незаряженных аминокислот, а также имеет меньшее количество внутримолекулярных взаимодействий, что может обеспечивать повышение его общей структурной гибкости и способствовать адаптации к низким температурам.

## ЛАКТАЗЫ

$\beta$ -Галактозидаза (КФ 3.2.1.23), более известная как лактаза, представляет собой гликозидгидролазу, которая гидролизует  $\beta$ -гликозидные связи  $\beta$ -галактозидов с образованием молекул глюкозы и галактозы. Основное применение  $\beta$ -галактозидазы в молочной промышленности заключается в гидролизе лактозы в молоке для получения безлактозной продукции, предназначенный для питания людей с непереносимостью лактозы. Другое применение  $\beta$ -галактозидазы заключается в переносе лактозы и моносахаридов в ряд галактоолигосахаридов, которые являются функциональными галактозилированными продуктами [22]. Адаптированная к холоду  $\beta$ -галактозидаза является важным пищевым ферментом, который гидролизует лактозу в молоке при низких температурах. Кроме того, отходы сырной промышленности, например сыворотка, преобразуются в более легко ферментируемую глюкозу и галактозу адаптированной к холоду  $\beta$ -галактозидазой [23].

М. Манджагалли и М. Лотти [1] рассмотрели классификацию, структуру, молекулярные механизмы адаптации к холоду и биотехнологическое применение холодаактивных  $\beta$ -галактозидаз. Данные авторы также представили их практическое применение при производстве безлактозных молочных продуктов и синтез гликозильных компонентов из молочной сыворотки для пищевой, косметической и фармацевтической промышленности.

Большинство известных  $\beta$ -галактозидаз представляют собой рекомбинантные ферменты, полученные путем генетической экспрессии, а не выделенные из природных источников.  $\beta$ -Галактозидаза (BgaPw) из психрофильной бактерии *Paenibacillus wynnii*, полученная рекомбинантным путем в *Escherichia coli*, представлена в работе [24]. Частично очищенный фермент имеет оптимум pH 7,0, температурный максимум 40 °C, высокую стабильность при 8 °C и период полураспада 77 дней. В сравнительном исследовании на молоке лактоза была полностью гидролизована  $\beta$ -галактозидазой (BgaPw) за 72 ч при температуре 8 °C, в то время как две другие известные  $\beta$ -галактозидазы были менее эффективны и гидролизовали только около 90% лактозы за тот же период времени.

Авторы работы [25] изучали способность штаммов бактерий, выделенных из образцов почвы и донных отложений Антарктического полуострова, продуцировать холодаактивные  $\beta$ -галактозидазы. Скрининг выявил 81 из 304 штаммов с активностью  $\beta$ -галактозидазы. Наибольшую активность показал штамм *Rahnella inusitata*, который продуцировал  $\beta$ -галактозидазу, активную при низких температурах (4–15 °C). Данный фермент обладал более высокой эффективностью по сравнению с коммерческим ферментом из *Aspergillus oryzae*.

Ген фосфо- $\beta$ -галактозидазы (BsGal1332) был клонирован из *Bacillus velezensis* SW5 и успешно экспрессирован в *Escherichia coli* BL21(DE3). На основании гомологии последовательностей BsGal1332 был отнесен к классу GH1 и продемонстрировал высокую гидролазную активность по отношению к лактозе с трансгликозилирующей активностью при низкой температуре [26].

Бактерия *Alteromonas* sp. ML52, выделенная из глубоководных морских вод, синтезирует внутриклеточную  $\beta$ -галактозидазу (Gal), адаптированную к холоду. Ген  $\beta$ -галактозидазы из штамма ML52 был клонирован и экспрессирован в *Escherichia coli*. Рекомбинантный фермент проявлял максимальную активность при 35 °C и pH 8,0. Анализ гидролиза лактозы, проведенный с использованием молока, показал, что более 90% лактозы в молоке было гидролизовано после инкубации в течение 5 ч при 25 °C или 24 ч при 4 и 10 °C. Данные характеристики предполагают, что Gal может быть полезна при производстве безлактозного молока в молочной промышленности [22].

### **КСИЛАНАЗЫ**

Ксиланазы катализируют гидролиз ксилана – основного компонента гемицеллюлозы в клеточных стенах растений. В зависимости от происхождения структура ксилана может существенно различаться. Ксиланазы используются в различных промышленных и биотехнологических процессах, включая молекулярную биологию, медицину, производство продуктов питания, напитков, моющих средств, текстиля [27]. Ксиланазы обладают высоким потенциалом в целлюлозно-бумажной промышленности. Они взаимодействуют с ксиланом в древесине, разрушая связи лигнин – углевод, тем самым улучшая качество бумаги при использовании в процессах биопульпирования и биоотбеливания [23, 28].

$\beta$ -1,3-Ксиланазы (КФ 3.2.1.32) – гидролитические ферменты, которые действуют на гидролиз  $\beta$ -1,3-ксилана. Они являются одними из важнейших гидролитических ферментов для получения олигосахаридов в качестве функциональных продуктов питания из морских водорослей. Ч.-В. Цай и др. [29] идентифицировали  $\beta$ -1,3-ксиланазу (Xyl1512) из глубоководной бактерии *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 и охарактеризовали ее биохимические свойства. Психрофильные и галофильные свойства фермента соответствуют требованиям пищевой промышленности к низкой температуре и высокой концентрации соли.

Эндо- $\beta$ -1,4-ксиланазы (КФ 3.2.1.8) способны гидролизовать гликозидную связь арабиноксиланов пшеницы и изменять их физико-химические свойства, тем самым улучшая свойства рафинированного пшеничного хлеба за счет уменьшения размера молекул и водоудерживающей способности некрахмальных полисахаридов,

присутствующих в пшеничной муке. Кроме того, пре-биотические ксилоолигосахариды, образующиеся при ферментативном гидролизе ксилана, также могут принести потенциальную пользу для здоровья. В работе [30] идентифицирована ксиланаза семейства гликозид-гидролаз 8 из миксобактерии *Sorangium cellulosum*. Полученная ксиланаза проявляла наибольшую активность при 50 °C, однако и при 4 °C частично сохраняла ее, также она показала широкую субстратную специфичность и стабильность pH. Добавление ксиланазы в низкой дозировке (0,05–0,20 мг/кг муки) улучшило удельный объем и текстуру хлеба, и эффект был лучше, чем у коммерческого мезофильного фермента.

С.М. Малик с соавторами [31] изучали способность грибов *Penicillium canescens* (BPF4), *Truncatella angustata* (BPF5) и *Pseudogymnoascus roseus* (BPF6) продуцировать внеклеточные ксиланазы при низкой температуре. Наибольшее количество ксиланазы продуцировал гриб *T. angustata* в процессе глубинной ферментации при 20 °C, pH 4,5 и 9,0.

### **ПРОТЕАЗЫ**

Протеазы (протеиназы или пептидазы) представляют собой класс гидролаз (КФ 3.4.21), расщепляющих пептидные цепи в белках. Протеазы относятся к многофункциональным ферментам, на долю которых приходится около 60% всего рынка ферментов, и широко используются в пищевой, фармацевтической, кожевенной, биотехнологической отраслях промышленности, при производстве моющих средств и переработке отходов [32].

Бактерии рода *Bacillus* способны продуцировать большое количество внеклеточных сериновых протеаз и являются основным источником почти всех сериновых щелочных протеаз, используемых в моющих средствах.

Психротрофная бактерия *Bacillus pumilus* B01, выделенная из почвы ледника в Гималаях, продуцирует холодаактивную сериновую щелочную протеазу Apr B01. Очищенная протеаза показала максимальную удельную активность (37,02 ед/мг) при 20 °C с казеином в качестве субстрата и сохраняла активность в диапазоне температур 5–35 °C и pH 6,0–12,0 с оптимальной температурой 20 °C при pH 9,0. Также она была более устойчива к органическим растворителям, поверхностно-активным веществам, ионам металлов и восстановителям, чем большинство щелочных протеаз [33].

Авторами работы [34] из образцов почвы озера Вулар (Кашмир, Южная Азия) выделена психротрофная бактерия *Bacillus subtilis* WLCP1, продуцирующая холодаактивную алкофильную протеазу. Оптимальное значение pH очищенной протеазы составило 10,0, также она была стабильна при pH 7,0–11,0. Оптимальная температура фермента составила 15 °C. Очищенная протеаза из *Bacillus subtilis* WLCP1 совместно с моющим средством улучшила удаление пятен при 15 °C, что делает ее перспективной в качестве добавки к моющему средству для холодной стирки из-за ее способности работать в алкофильных диапазонах pH и низкой температуре.

Холодаактивная внеклеточная протеаза была выделена из морской бактерии *Planococcus* sp. M7 [35]. Фермент проявлял щелочную мезофильную активность при оптимальном значении pH 10,0 и температуре 35 °C. Также он сохранял свою активность при температуре от 5 °C до 35 °C и был устойчив к многократному

замораживанию и оттаиванию, но полностью инактивировался при температуре 55 °С. Активность фермента увеличивалась на 17,5% в присутствии  $Fe^{3+}$  и на 6,3% – в присутствии  $Ca^{2+}$ . Протеаза также показала хорошую стабильность и совместимость со стандартными моющими средствами, не содержащими ферментов, что указывает на возможность ее использования при разработке моющих средств.

В статье [36] сообщается о протеазе, синтезируемой психротрофным бактериальным штаммом *Chryseobacterium polytrichastrum* ERMR1:04. Полученная протеаза была активна в широком диапазоне температур 5–65 °С (оптимум при 37 °С) и pH 6,0–10,0 (оптимум при pH 8,0), ингибиравалась ЭДТА и 1,10-фенантролином, активировалась  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , гексаном и сохраняла свою активность с поверхностно-активными веществами и моющими средствами. Гидролиз соевого белка протеазой ERMR1:04 позволял получить пептиды, обладающие антиоксидантными свойствами.

Авторы работы [37] идентифицировали протеазу (Pro21717), активную при низких температурах, из психрофильной бактерии *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717 и определили кристаллическую структуру ее катализитического домена с разрешением 1,4 Å. Структурные различия, обнаруженные в Pro21717-CD, включая длину петли активного центра и размер субстратного кармана, указывают на более широкий сайт связывания субстрата. Данные особенности могут способствовать уменьшению конформационных изменений, необходимых для формирования промежуточного комплекса ацил – фермент, тем самым способствуя снижению оптимальной температуры и энергии активации катализируемой реакции.

В процессе скрининга бактериальных штаммов, выделенных из почвы предгорья ледника в холмах Ларсеманн (Восточная Антарктида), на способность продуцировать ферменты, активные при низких температурах, был выбран штамм *Psychrobacter* sp. 94-6РВ. С помощью сравнительного анализа геномов *Psychrobacter* была идентифицирована кодирующая последовательность внеклеточной сериновой протеазы, амплифицированная с помощью полимеразной цепной реакции в штамме 94-6РВ и экспрессированная в *Escherichia coli*. Очищенный фермент (80 кДа) оказался щелочной протеазой, которая наиболее активна при температурах 20–30 °С и pH 7,0–9,0. Полученный фермент стабилен в присутствии обычных ингибиторов ( $\beta$ -меркаптоэтанола, дитиотреитола, мочевины, фенилметилсульфонилфторида и ЭДТА) и совместим с моющими средствами и поверхностно-активными веществами (Tween 20, Tween 80, перекись водорода и Triton X-100). Благодаря этим свойствам протеаза P94-6РВ может быть полезна для получения новых видов стиральных порошков для холодной стирки, а также в других областях промышленности [38].

## ЛИПАЗЫ

Липазы (КФ 3.1.1.3) являются широко распространенными ферментами, которые катализируют гидролиз длинноцепочечных триацилглицеринов до жирных кислот и глицерина [39]. Липазы являются эффективными биокатализаторами в реакциях этерификации, переэтерификации, алкоголиза, ацидолиза, аминолиза, а также гидролизуют

органические карбонаты, благодаря чему находят применение в пищевой, нефтехимической, косметической, фармацевтической, текстильной отраслях промышленности, при производстве моющих средств, очистке сточных вод, дублении и производстве биодизеля [40, 41].

После успешного применения протеаз липазы также были включены в состав стиральных порошков. Во время стирки липазы адсорбируются на поверхности ткани, а затем гидролизуют масляные пятна, присутствующие на ней. Липазы, совместимые с моющими средствами, должны быть стабильны в щелочной среде, растворимы в воде, обладать низкой субстратной специфичностью, устойчивы к поверхностно-активным веществам и действию протеаз, входящих в состав моющих средств. В работе С. Сахай, Д. Чухан [42] получены липазы из психротрофных грибковых изолятов *Penicillium canescens* BPF4 и *Pseudogymnoascus roseus* BPF6. Липазы BPF4 и BPF6 показали максимальную активность при pH 11,0 и 9,0 соответственно и при 40 °С. Остаточная активность при 20 °С и 4 °С липазы BPF4 составила 35 и 20%, а липазы BPF6 – 70 и 20% соответственно. Оба фермента оказались стабильны при 4, 20 и 40 °С в течение 2 ч, теряя не более 20% активности. Наличие ионов  $Ca^{2+}$  способствовало увеличению их катализитической активности почти в 3 раза, однако они ингибиравались под действием  $NaClO_3$  и  $H_2O_2$ . После 1 ч инкубации в выбранных марках моющих средств (Tide, Ariel, Wheel и Surf Excel) обе липазы сохраняли 90% своей катализитической активности, что указывает на их потенциал для включения в состав моющих средств.

Низкомолекулярная (27 кДа) щелочная (pH 9,0) холодаактивная (20 °С) липаза из *Acinetobacter radioresistens* PR8 представлена в работе [43]. Основываясь на активирующем липазу роли ионов  $Mn^{2+}$  и  $Na^+$ , оптимальной температуре, pH, отсутствии хромогенных субстратов и индикаторных красителей, был разработан новый метод зимографии для определения липазы.

В результате скрининга штаммов бактерий, выделенных из образцов глубоководных отложений, идентифицирован штамм *Pseudomonas marinensis* gcc21. В геноме штамма gcc21 выявлены два новых гена, кодирующих холодаактивные липазы (липаза 1 и липаза 2). Гены, кодирующие липазу 1 и липазу 2, были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции и вставлены в сайты рестрикции экспрессионной плазиды pET-28a (+). Липаза 1 была клонирована в pET-28a (+) с помощью эндонуклеаз рестрикции *EcoR* I и *Xho* I, а липаза 2 была клонирована в pET-28a (+) с помощью эндонуклеаз рестрикции *Hind* III и *Bam* HI соответственно. Обе липазы проявляли наибольшую активность при 4 °С. Однако катализическая активность липазы 2 была выше, чем у липазы 1, при различных тестируемых значениях pH и температуры. Кроме того, липаза 2 была более стабильной, чем липаза 1, при обработке различными ионами металлов, дегергентами, потенциальными ингибиторами и органическими растворителями [8].

Холодаактивная щелочная липаза, полученная с помощью бактериального изолята *Pseudomonas* sp. A6, выделенного из образцов морской воды Средиземного моря (Александрия, Египет), представлена в работе [44]. Очищенная липаза с молекулярной массой 65 кДа проявляла максимальную активность 23,36 U/мл при pH 8,0, температуре 10 °С и среде следующего компонентного

состава, г/л: пептон – 7,14; соевое масло – 7,5% (об/об.);  $K_2HPO_4$  – 0,4;  $MgSO_4$  – 0,1; глюкоза – 2.

В работе [45] представлена характеристика холодаактивной липазы психротрофной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5T, обладающей высокой активностью при низких температурах и широкой субстратной специфичностью. Эти свойства Lip1Pc представляют значительный интерес для биотехнологического применения. Фермент проявлял максимальную липолитическую активность при 25 °C и pH 8,0 с использованием р-нитрофенилдодецианоата в качестве субстрата. Повышение температуры выше 40 °C, добавление различных ионов металлов и органических растворителей подавляло ферментативную активность Lip1Pc. Большинство неионных детергентов, таких как Triton X-100 и Tween-20, увеличивало активность липазы, в то время как додецилсульфат натрия полностью ингибировал ее.

Д.А. Русакова с соавторами [46] изучали эвритермные и психротолерантные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*. Исследуемые штаммы представляют научный и практический интерес благодаря проявлению ферментативной активности к нескольким субстратам одновременно при разных температурах (4 и 25 °C), а также способности продуцировать холодаактивную липазу, пектиназу и протеазу. Выделенные штаммы отличались высокой фосфат-сольбилизирующей активностью как при 4, так и при 25 °C.

## АМИЛАЗЫ

Амилазы – это внеклеточные ферменты, которые гидролизуют крахмал до олигосахаридов и глюкозы. Например,  $\alpha$ -амилазы (КФ 3.2.1.1) относятся к классу гидролаз, которые случайным образом расщепляют 1,4- $\alpha$ -D-глюкозидные связи между соседними глюкозными звеньями в линейной амилазной цепи крахмала. Амилазы являются одними из важнейших промышленных ферментов, используемых в пищевой, текстильной, бумажной и биотехнологической областях. Промышленные методы переработки крахмала требуют интенсивного потребления энергии, и поэтому необходимо разрабатывать более энергоэффективные процессы [47]. Использование амилазы для гидролиза крахмала приводит к снижению потребления энергии по сравнению с традиционными физико-химическими процессами. Коммерческий интерес к амилазам постоянно растет, так как продукты гидролиза крахмала используются для производства сиропа глюкозы, различных напитков, текстиля, биоэтанола и моющих средств [48–50].

Холодаактивные амилазы представляют интерес для целого ряда промышленных процессов, таких как производство моющих средств для холодной стирки,

биоремедиация, осахаривание крахмала, производство биотоплива, для пищевой, текстильной, спиртовой, бумажной, фармацевтической промышленностей и молекулярной биологии.

Холодаактивная  $\alpha$ -амилаза из штамма *Bacillus cereus* RGUJS2023 описана в работе [51]. Выделенный фермент показал максимальную активность с 2%-м раствором крахмала при 28 °C и pH 6,5 после 30 мин инкубации и был стабилен при комнатной температуре (30 °C) в течение длительного периода времени. Активность фермента увеличивалась в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Sn^{2+}$  и ингибировалась в присутствии  $Pb^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ .

Н. Арабачи и Б. Арикан в своей работе [52] представили холодаактивную щелочную  $\alpha$ -амилазу, синтезируемую *Bacillus subtilis* N8 при 15 °C и pH 10,0 на агаровых пластинах, содержащих крахмал. Полученный фермент проявлял наибольшую активность при 25 °C и pH 8,0, также был высокостабилен в щелочной среде (pH 8,0–12,0) и сохранял 96% своей исходной активности при низких температурах (10–40 °C) в течение 24 ч. Активность амилазы увеличивалась в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола (103%) и ингибировалась под действием ионов  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $H_2O_2$  и Triton X-100. Фермент показал устойчивость к некоторым денатурирующим веществам, таким как SDS, ЭДТА и мочевина (52, 65 и 42% соответственно).  $\alpha$ -Амилаза N8 показала максимальную остаточную активность 56% с 3% NaCl. Полученная холодаактивная  $\alpha$ -амилаза перспективна для производства моющих средств, продуктов питания, в процессах биоремедиации и производстве пребиотиков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время исследования холодаактивных ферментов не теряют актуальности. Психрофильные и психротрофные микроорганизмы привлекают внимание исследователей во всем мире из-за их уникальной метаболической способности продуцировать холодаактивные ферменты. Существуют научные предпосылки по созданию индивидуальных и комплексных холодаактивных ферментных препаратов. Область применения данных ферментов включает пищевую, фармацевтическую, текстильную промышленности, производство моющих средств, молекулярную биологию и др. Это связано с их способностью катализировать реакции при низких температурах, что делает процесс гидролиза более экономически выгодным и эффективным. Поиск и изучение новых холодаактивных ферментов открывает новые возможности проведения технологических процессов и может способствовать решению биотехнологических и экологических проблем.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mangiagalli M., Lotti M. Cold-active  $\beta$ -galactosidases: insight into cold adaptation mechanisms and biotechnological exploitation // Marine Drugs. 2021. Vol. 19, no. 1. P. 43. DOI: 10.3390/md19010043.
2. Margesin R., Collins T. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol. 103. P. 2537–2549. DOI: 10.1007/s00253-019-09631-3.
3. Troncoso E., Barahona S., Carrasco M., Villarreal P., Alcaíno J., Cifuentes V., et al. Identification and character-  
ization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula // Polar Biology. 2017. Vol. 40. P. 649–658. DOI: 10.1007/s00300-016-1988-9.
4. Hamid B., Bashir Z., Yatoo A.M., Mohiddin F., Majeed N., Bansal M., et al. Cold-active enzymes and their potential industrial applications – a review // Molecules. 2022. Vol. 27, no. 18. P. 5885. DOI: 10.3390/molecules27185885.
5. Zhang J., Liu R., Xi S., Cai R., Zhang X., Sun C. A novel bacterial thiosulfate oxidation pathway provides a new clue about the formation of zero-valent sulfur in deep

sea // The ISME Journal. 2020. Vol. 14. P. 2261–2274. DOI: 10.1038/s41396-020-0684-5.

**6.** Furhan J., Salaria N., Jabeen M., Qadri J. Partial purification and characterisation of cold-active metalloprotease by *Bacillus* sp. Ap1 from Apharwat peak, Kashmir // Pakistan Journal of Biotechnology. 2019. Vol. 16, no. 1. P. 47–54. DOI: 10.34016/pjbt.2019.16.1.8.

**7.** Mangiagalli M., Brocca S., Orlando M., Lotti M. The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins // New Biotechnology. 2020. Vol. 55. P. 5–11. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.09.003.

**8.** Guo C., Zheng R., Cai R., Sun C., Wu S. Characterization of two unique cold-active lipases derived from a novel deep-sea cold seep bacterium // Microorganisms. 2021. Vol. 9, no. 4. P. 802. DOI: 10.3390/microorganisms9040802.

**9.** Stark C., Bautista-Leung T., Siegfried J., Herschlag D. System investigation of the link between enzyme catalysis and cold adaptation // eLife. 2022. Vol. 11. P. e72884. DOI: 10.7554/eLife.72884.

**10.** Santiago M., Ramírez-Sarmiento C.A., Zamora R.A., Parra L.P. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes // Frontiers in Microbiology. 2016. Vol. 7. P. 1408. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01408.

**11.** Parvizpour S., Hussin N., Shamsir M.S., Razmara J. Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications // Applied Microbiology and Biotechnology. 2021. Vol. 105, no. 3. P. 899–907. DOI: 10.1007/s00253-020-11074-0.

**12.** Collins T., Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol. 103. P. 2857–2871. DOI: 10.1007/s00253-019-09659-5.

**13.** Pucci F., Rooman M. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation // Current Opinion in Structural Biology. 2017. Vol. 42. P. 117–128. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.12.007.

**14.** Brocca S., Ferrari C., Barbiroli A., Pesce A., Lotti M., Nardini M. A bacterial acyl aminoacyl peptidase couples flexibility and stability as a result of cold adaptation // The FEBS Journal. 2016. Vol. 283, no. 23. P. 4310–4324. DOI: 10.1111/febs.13925.

**15.** Mangiagalli M., Lapi M., Maione S., Orlando M., Brocca S., Pesce A., et al. The co-existence of cold activity and thermal stability in an Antarctic GH42  $\beta$ -galactosidase relies on its hexameric quaternary arrangement // The FEBS Journal. 2021. Vol. 288, no. 2. P. 546–565. DOI: 10.1111/febs.15354.

**16.** Zanphorlin L.M., de Giuseppe P.O., Honorato R.V., Tonoli C.C.C., Fattori J., Crespim E., et al. Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7 // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. P. 23776. DOI: 10.1038/srep23776.

**17.** Bruno S., Coppola D., di Prisco G., Giordano D., Verde C. Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications // Marine Drugs. 2019. Vol. 17, no. 10. P. 544. DOI: 10.3390/md17100544.

**18.** Li Z., Wang L., Ren Y., Huang Y., Liu W., Lv Z., et al. Arginase: shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases // Cell Death Discovery. 2022. Vol. 8. P. 413. DOI: 10.1038/s41420-022-01200-4.

**19.** Niu F., Yu Y., Li Z., Ren Y., Li Z., Ye Q., et al. Arginase:

an emerging and promising therapeutic target for cancer treatment // Biomedicine and Pharmacotherapy. 2022. Vol. 149. P. 112840. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112840.

**20.** Caldwell R.W., Rodriguez P.C., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.B. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease // Physiological Reviews. 2018. Vol. 98, no. 2. P. 641–665. DOI: 10.1152/physrev.00037.2016.

**21.** Yusof N.Y., Quay D.H.X., Kamaruddin S., Jonet M.A., Md Illias R., Mahadi N.M., et al. Biochemical and in silico structural characterization of a cold-active arginase from the psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12 // Extremophiles. 2024. Vol. 28. P. 15. DOI: 10.1007/s00792-024-01333-7.

**22.** Sun J., Yao C., Wang W., Zhuang Z., Liu J., Dai F., et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from the deep-sea bacterium *Alteromonas* sp. ML52 // Marine Drugs. 2018. Vol. 16, no. 12. P. 469. DOI: 10.3390/md16120469.

**23.** Kuddus M., Roohi, Bano N., Sheik G.B., Joseph B., Hamid B., et al. Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications // Microbial Biotechnology. 2024. Vol. 17, no. 4. P. e14467. DOI: 10.1111/1751-7915.14467.

**24.** Lutz-Wahl S., Mozer H., Kussler A., Schulz A., Seitl I., Fischer L. A new  $\beta$ -galactosidase from *Paenibacillus wynnii* with potential for industrial applications // Journal of Dairy Science. 2024. Vol. 107, no. 6. P. 3429–3442. DOI: 10.3168/jds.2023-24122.

**25.** Núñez-Montero K., Salazar R., Santos A., Gómez-Espinoza O., Farah S., Troncoso C., et al. Antarctic *Rahnella inusitata*: a producer of cold-stable  $\beta$ -galactosidase enzymes // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, no. 8. P. 4144. DOI: 10.3390/ijms22084144.

**26.** Liu Y., Wu Z., Zeng X., Weng P., Zhang X., Wang C. A novel cold-adapted phospho-beta-galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk // International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 166. P. 760–770. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.233.

**27.** Kumar D., Kumar S.S., Kumar J., Kumar O., Mishra S.V., Kumar R., et al. Xylanases and their industrial applications: a review // Biochemical and Cellular Archives. 2017. Vol. 17, no. 1. P. 353–360.

**28.** Pandey L.K., Kumar A., Dutt D., Singh S.P. Influence of mechanical operation on the biodegradation of *Leucaena leucocephala* by xylanase treatment // 3 Biotech. 2022. Vol. 12. P. 20. DOI: 10.1007/s13205-021-03024-y.

**29.** Cai Z.-W., Ge H.-H., Yi Z.-W., Zeng R.-Y., Zhang G.-Y. Characterization of a novel psychrophilic and halophilic  $\beta$ -1, 3-xylanase from deep-sea bacterium, *Flammeovirga pacifica* strain WPAGA1 // International Journal of Biological Macromolecules. 2018. Vol. 118. P. 2176–2184. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.090.

**30.** Li X., Zhang L., Jiang Z., Liu L., Wang J., Zhong L., et al. A novel cold-active GH8 xylanase from cellulolytic myxobacterium and its application in food industry // Food Chemistry. 2022. Vol. 393. P. 133463. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133463.

**31.** Malik S.M., Ayub M., Bhadra A., Manjula A.C., Modi R., Lavanya G., et al. Screening and production of cold-active xylanase from *Truncatella Angustata* (Bpf5) under submerged fermentation // European Chemical Bulletin. 2023. Vol. 12, no. 10. P. 422–430. DOI: 10.48047/ecb/2023.12.si10.0046.

- 32.** Song P., Zhang X., Wang S., Xu W., Wang F., Fu R., et al. Microbial proteases and their applications // *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1236368. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1236368.
- 33.** Farooq S., Nazir R., Ganai S.A., Ganai B.A. Isolation and characterization of a new cold-active protease from psychrotrophic bacteria of Western Himalayan glacial soil // *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 12768. DOI: 10.1038/s41598-021-92197-w.
- 34.** Furhan J., Awasthi P., Sharma S. Biochemical characterization and homology modelling of cold-active alkophilic protease from Northwestern Himalayas and its application in detergent industry // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019. Vol. 17. P. 726–735. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.01.028.
- 35.** Chen K., Mo Q., Liu H., Yuan F., Chai H., Lu F., et al. Identification and characterization of a novel cold-tolerant extracellular protease from *Planococcus* sp. CGMCC 8088 // *Extremophiles*. 2018. Vol. 22. P. 473–484. DOI: 10.1007/s00792-018-1010-2.
- 36.** Mukhia S., Kumar A., Kumar R. Generation of antioxidant peptides from soy protein isolate through psychrotrophic *Chryseobacterium* sp. derived alkaline broad temperature active protease // *LWT*. 2021. Vol. 143. P. 111152. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111152.
- 37.** Park H.J., Lee C.W., Kim D., Do H., Han S.J., Kim J.E., et al. Crystal structure of a cold-active protease (Pro21717) from the psychrophilic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717, at 1.4 Å resolution: structural adaptations to cold and functional analysis of a laundry detergent enzyme // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, no. 2. P. e0191740. DOI: 10.1371/journal.pone.0191740.
- 38.** Perfumo A., Freiherr von Sass G.J., Nordmann E.-L., Budisa N., Wagner D. Discovery and characterization of a new cold-active protease from an extremophilic bacterium via comparative genome analysis and *in vitro* expression // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 881. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00881.
- 39.** Adetunji A.I., Olaniran A.O. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 52. P. 1257–1269. DOI: 10.1007/s42770-021-00503-5.
- 40.** Ali S., Khan S.A., Hamayun M., Lee I.-J. The recent advances in the utility of microbial lipases: a review // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, no. 2. P. 510. DOI: 10.3390/microorganisms11020510.
- 41.** Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // *Microbial Cell Factories*. 2020. Vol. 19. P. 169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
- 42.** Sahay S., Chouhan D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018. Vol. 16, no. 2. P. 319–325. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.04.006.
- 43.** Gupta K.K., Jagtap S., Priya R., Ramadas K. Purification, characterization of alkaline cold active lipase from *Acinetobacter radioresistens* PR8 and development of a new zymography method for lipase detection // *Protein and Peptide Letters*. 2018. Vol. 25, no. 10. P. 897–907. DOI: 10.2174/0929866525666180905113206.
- 44.** Abdella B., Youssif A.M., Sabry S.A., Ghozlan H.A. Production, purification, and characterization of cold-active lipase from the psychrotroph *Pseudomonas* sp. A6 // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023. Vol. 54. P. 1623–1633. DOI: 10.1007/s42770-023-01079-y.
- 45.** Новотоцкая-Власова К.А., Петровская Л.Е., Ривкина Е.М., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Характеристика холодаактивной липазы *Psychrobacter cryohalolentis* K5T и ее делеционных мутантов // *Биохимия*. 2013. Т. 78. № 4. С. 501–512. EDN: QBLFAB.
- 46.** Русакова Д.А., Сидоренко М.Л., Ким А.В. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из глинистых органогенных отложений пещеры мраморная (Приморский край) // *Микробиология*. 2024. Т. 93. № 1. С. 79–90. DOI: 10.31857/S0026365624010086. EDN: EOPWGG.
- 47.** Nwagu T.N., Aoyagi H., Okolo B., Moneke A., Yoshida S. Citraconylation and maleylation on the catalytic and thermodynamic properties of raw starch saccharifying amylase from *Aspergillus carbonarius* // *Helion*. 2020. Vol. 6, no. 7. P. e04351. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04351.
- 48.** Kizhakedathil M.P.J., Devi C.S. Acid stable  $\alpha$ -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19 – production, purification and characterization // *Biotechnology Reports*. 2021. Vol. 30. P. e00603. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00603.
- 49.** Frantz S.C., Paludo L.C., Stutz H., Spier M.R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019. Vol. 17. P. 82–92. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.004.
- 50.** Cakmak U., Tuncay F.O., Kolcuoglu Y. Cold active  $\alpha$ -amylase obtained from *Cladophora hutchinsiae* – purification, biochemical characterization and some potential applications // *Food Bioscience*. 2022. Vol. 50. P. 102078. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.102078.
- 51.** Samanta A., Pradhan S., Jana S.C. Cold active amylase production from *Bacillus cereus* RGUJS2023 // *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2023. Vol. 7, no. 11. P. 5172–5177. DOI: 10.26538/tjnpr/v7i11.20.
- 52.** Arabaci N., Arikhan B. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable  $\alpha$ -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8 // *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2018. Vol. 48, no. 5. P. 419–426. DOI: 10.1080/10826068.2018.1452256.

#### REFERENCES

- 1.** Mangiagalli M., Lotti M. Cold-active  $\beta$ -galactosidases: insight into cold adaptation mechanisms and biotechnological exploitation. *Marine Drugs*. 2021;19(1):43. DOI: 10.3390/md19010043.
- 2.** Margesin R., Collins T. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103:2537–2549. DOI: 10.1007/s00253-019-09631-3.
- 3.** Troncoso E., Barahona S., Carrasco M., Villarreal P., Alcaíno J., Cifuentes V., et al. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*. 2017;40:649–658. DOI: 10.1007/s00300-016-1988-9.
- 4.** Hamid B., Bashir Z., Yatoo A.M., Mohiddin F., Majeed N., Bansal M., et al. Cold-active enzymes and their potential industrial applications – a review. *Molecules*.

2022;27(18):5885. DOI: 10.3390/molecules27185885.

**5.** Zhang J., Liu R., Xi S., Cai R., Zhang X., Sun C. A novel bacterial thiosulfate oxidation pathway provides a new clue about the formation of zero-valent sulfur in deep sea. *The ISME Journal*. 2020;14:2261-2274. DOI: 10.1038/s41396-020-0684-5.

**6.** Furhan J., Salaria N., Jabeen M., Qadri J. Partial purification and characterisation of cold-active metalloprotease by *Bacillus* sp. Ap1 from Apharwat peak, Kashmir. *Pakistan Journal of Biotechnology*. 2019;16(1):47-54. DOI: 10.34016/pjbt.2019.16.1.8.

**7.** Mangiagalli M., Brocca S., Orlando M., Lotti M. The "cold revolution". Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins. *New Biotechnology*. 2020;55:5-11. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.09.003.

**8.** Guo C., Zheng R., Cai R., Sun C., Wu S. Characterization of two unique cold-active lipases derived from a novel deep-sea cold seep bacterium. *Microorganisms*. 2021;9(4):802. DOI: 10.3390/microorganisms9040802.

**9.** Stark C., Bautista-Leung T., Siegfried J., Herschlag D. System investigation of the link between enzyme catalysis and cold adaptation. *eLife*. 2022;11:e72884. DOI: 10.7554/eLife.72884.

**10.** Santiago M., Ramírez-Sarmiento C.A., Zamora R.A., Parra L.P. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1408. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01408.

**11.** Parvizpour S., Hussin N., Shamsir M.S., Razmara J. Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105(3):899-907. DOI: 10.1007/s00253-020-11074-0.

**12.** Collins T., Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103:2857-2871. DOI: 10.1007/s00253-019-09659-5.

**13.** Pucci F., Roodman M. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017;42:117-128. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.12.007.

**14.** Brocca S., Ferrari C., Barbiroli A., Pesce A., Lotti M., Nardini M. A bacterial acyl aminoacyl peptidase couples flexibility and stability as a result of cold adaptation. *The FEBS Journal*. 2016;283(23):4310-4324. DOI: 10.1111/febs.13925.

**15.** Mangiagalli M., Lapi M., Maione S., Orlando M., Brocca S., Pesce A., et al. The co-existence of cold activity and thermal stability in an Antarctic GH42  $\beta$ -galactosidase relies on its hexameric quaternary arrangement. *The FEBS Journal*. 2021;288(2):546-565. DOI: 10.1111/febs.15354.

**16.** Zanphorlin L.M., de Giuseppe P.O., Honorato R.V., Tonoli C.C.C., Fattori J., Crespim E., et al. Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *Scientific Reports*. 2016;6:23776. DOI: 10.1038/srep23776.

**17.** Bruno S., Coppola D., di Prisco G., Giordano D., Verde C. Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. *Marine Drugs*. 2019;17(10):544. DOI: 10.3390/MD17100544.

**18.** Li Z., Wang L., Ren Y., Huang Y., Liu W., Lv Z., et al. Arginase: shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. *Cell Death Discovery*. 2022;8:413. DOI: 10.1038/s41420-022-01200-4.

**19.** Niu F., Yu Y., Li Z., Ren Y., Li Z., Ye Q., et al. Arginase: an emerging and promising therapeutic target for cancer treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022;149:112840. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112840.

**20.** Caldwell R.W., Rodriguez P.C., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.B. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*. 2018;98(2):641-665. DOI: 10.1152/physrev.00037.2016.

**21.** Yusof N.Y., Quay D.H.X., Kamaruddin S., Jonet M.A., Md Illias R., Mahadi N.M., et al. Biochemical and in silico structural characterization of a cold-active arginase from the psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12. *Extremophiles*. 2024;28:15. DOI: 10.1007/s00792-024-01333-7.

**22.** Sun J., Yao C., Wang W., Zhuang Z., Liu J., Dai F., et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from the deep-sea bacterium *Alteromonas* sp. ML52. *Marine Drugs*. 2018;16(120):469. DOI: 10.3390/MD16120469.

**23.** Kuddus M., Roohi, Bano N., Sheik G.B., Joseph B., Hamid B., et al. Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*. 2024;17(4):e14467. DOI: 10.1111/1751-7915.14467.

**24.** Lutz-Wahl S., Mozer H., Kussler A., Schulz A., Seidl I., Fischer L. A new  $\beta$ -galactosidase from *Paenibacillus wynnii* with potential for industrial applications. *Journal of Dairy Science*. 2024;107(6):3429-3442. DOI: 10.3168/jds.2023-24122.

**25.** Núñez-Montero K., Salazar R., Santos A., Gómez-Espinoza O., Farah S., Troncoso C., et al. Antarctic *Rahnella inusitata*: a producer of cold-stable  $\beta$ -galactosidase enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(8):4144. DOI: 10.3390/ijms22084144.

**26.** Liu Y., Wu Z., Zeng X., Weng P., Zhang X., Wang C. A novel cold-adapted phospho-beta-galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;166:760-770. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.233.

**27.** Kumar D., Kumar S.S., Kumar J., Kumar O., Mishra S.V., Kumar R., et al. Xylanases and their industrial applications: a review. *Biochemical and Cellular Archives*. 2017;17(1):353-360.

**28.** Pandey L.K., Kumar A., Dutt D., Singh S.P. Influence of mechanical operation on the biodegradation of *Leucaena leucocephala* by xylanase treatment. *3 Biotech*. 2022;12:20. DOI: 10.1007/s13205-021-03024-y.

**29.** Cai Z.-W., Ge H.-H., Yi Z.-W., Zeng R.-Y., Zhang G.-Y. Characterization of a novel psychrophilic and halophilic  $\beta$ -1, 3-xylanase from deep-sea bacterium, *Flammeovirga pacifica* strain WPAGA1. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;118:2176-2184. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.090.

**30.** Li X., Zhang L., Jiang Z., Liu L., Wang J., Zhong L., et al. A novel cold-active GH8 xylanase from cellulolytic myxobacterium and its application in food industry. *Food Chemistry*. 2022;393:133463. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133463.

**31.** Malik S.M., Ayub M., Bhadra A., Manjula A.C., Modi R., Lavanya G., et al. Screening and production of cold-active xylanase from *Truncatella Angustata* (Bpf5) under submerged fermentation. *European Chemical Bulletin*. 2023;12(10):422-430. DOI: 10.48047/ecb/2023.12.si10.0046.

- 32.** Song P., Zhang X., Wang S., Xu W., Wang F., Fu R., et al. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1236368. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1236368.
- 33.** Farooq S., Nazir R., Ganai S.A., Ganai B.A. Isolation and characterization of a new cold-active protease from psychrotrophic bacteria of Western Himalayan glacial soil. *Scientific Reports*. 2021;11(1):12768. DOI: 10.1038/s41598-021-92197-w.
- 34.** Furhan J., Awasthi P., Sharma S. Biochemical characterization and homology modelling of cold-active alkophilic protease from Northwestern Himalayas and its application in detergent industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;17:726-735. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.01.028.
- 35.** Chen K., Mo Q., Liu H., Yuan F., Chai H., Lu F., et al. Identification and characterization of a novel cold-tolerant extracellular protease from *Planococcus* sp. CGMCC 8088. *Extremophiles*. 2018;22:473-484. DOI: 10.1007/s00792-018-1010-2.
- 36.** Mukhia S., Kumar A., Kumar R. Generation of antioxidant peptides from soy protein isolate through psychrotrophic *Chryseobacterium* sp. derived alkaline broad temperature active protease // LWT. 2021;143:111152. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111152.
- 37.** Park H.J., Lee C.W., Kim D., Do H., Han S.J., Kim J.E., et al. Crystal structure of a cold-active protease (Pro21717) from the psychrophilic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717, at 1.4 Å resolution: structural adaptations to cold and functional analysis of a laundry detergent enzyme. *PLoS One*. 2018;13(2):e0191740. DOI: 10.1371/journal.pone.0191740.
- 38.** Perfumo A., Freiherr von Sass G.J., Nordmann E.-L., Budisa N., Wagner D. Discovery and characterization of a new cold-active protease from an extremophilic bacterium via comparative genome analysis and *in vitro* expression. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:881. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00881.
- 39.** Adetunji A.I., Olaniran A.O. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021;52:1257-1269. DOI: 10.1007/s42770-021-00503-5.
- 40.** Ali S., Khan S.A., Hamayun M., Lee I.-J. The recent advances in the utility of microbial lipases: a review. *Microorganisms*. 2023;11(2):510. DOI: 10.3390/microorganisms11020510.
- 41.** Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. 2020;19:169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
- 42.** Sahay S., Chouhan D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018;16(2):319-325. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.04.006.
- 43.** Gupta K.K., Jagtap S., Priya R., Ramadas K. Purification, characterization of alkaline cold active lipase from *Acinetobacter radioresistens* PR8 and development of a new zymography method for lipase detection. *Protein and Peptide Letters*. 2018;25(10):897-907. DOI: 10.2174/0929866525666180905113206.
- 44.** Abdella B., Youssif A.M., Sabry S.A., Ghozlan H.A. Production, purification, and characterization of cold-active lipase from the psychrotroph *Pseudomonas* sp. A6. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023;54:1623-1633. DOI: 10.1007/s42770-023-01079-y.
- 45.** Novototskaya-Vlasova K.A., Rivkina E.M., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Characterization of a cold-active lipase from psychrobacter *cryohalolentis* k5t and its deletion mutants. *Biohimiya*. 2013;78(4):501-512. (In Russian). EDN: QBLFAB.
- 46.** Rusakova D.A., Sidorenko M.L.1, Kim A.V. Characteristics of Psychrotolerant bacteria isolated from clay organogenic deposits of mramorny cave (Primorsky territory). *Mikrobiologiya*. 2024;93(1):79-90. (In Russian). DOI: 10.31857/S0026365624010086. EDN: EOPWGG.
- 47.** Nwagu T.N., Aoyagi H., Okolo B., Moneke A., Yoshida S. Citraconylation and maleylation on the catalytic and thermodynamic properties of raw starch saccharifying amylase from *Aspergillus carbonarius*. *Helijon*. 2020;6(7):e04351. DOI: 10.1016/j.helijon.2020.e04351.
- 48.** Kizhakedathil M.P.J., Devi C S. Acid stable  $\alpha$ -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19 – production, purification and characterization. *Biotechnology Reports*. 2021;30:e00603. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00603.
- 49.** Frantz S.C., Paludo L.C., Stutz H., Spier M.R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;17:82-92. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.004.
- 50.** Cakmak U., Tuncay F.O., Kolcuoğlu Y. Cold active  $\alpha$ -amylase obtained from *Cladophora hutchinsiae* – purification, biochemical characterization and some potential applications. *Food Bioscience*. 2022;50:102078. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.102078.
- 51.** Samanta A., Pradhan S., Jana S.C. Cold active amylase production from *Bacillus cereus* RGUJS2023. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2023;7(11):5172-5177. DOI: 10.26538/tjnpr/v7i11.20.
- 52.** Arabaci N., Arikan B. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable  $\alpha$ -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2018;48(5):419-426. DOI: 10.1080/10826068.2018.1452256.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Белова Дарья Дмитриевна,**  
к.т.н., старший научный сотрудник,  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт пищевых добавок –  
филиал Федерального научного центра  
пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,  
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный  
проспект, 55, Российская Федерация,  
✉ antonina-daria@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0630-7658>

**Шарова Наталья Юрьевна,**  
д.т.н., профессор РАН,  
заместитель директора по научной работе,  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт пищевых добавок –  
филиал Федерального научного центра  
пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,  
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный  
проспект, 55, Российская Федерация,  
natalya\_sharova1@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4208-9299>

### Вклад авторов

Белова Дарья Дмитриевна – разработка  
концепции, проведение исследования,  
написание черновика рукописи.  
Шарова Наталья Юрьевна – научное  
руководство, редактирование рукописи.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии  
конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили  
окончательный вариант рукописи.

### Информация о статье

Поступила в редакцию 02.12.2024.  
Одобрена после рецензирования 17.03.2025.  
Принята к публикации 06.11.2025.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Daria D. Belova,**  
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,  
All-Russian Research Institute of Food Additives –  
a branch of the Federal Scientific Center  
for Food Systems named after V.M. Gorbatov,  
Russian Academy of Science,  
55, Liteiny Ave., Saint Petersburg, 191014,  
Russian Federation,  
✉ antonina-daria@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0630-7658>

**Natalya Yu. Sharova,**  
Dr. Sci. (Engineering),  
Professor of the Russian Academy of Science,  
Deputy Director for Research,  
All-Russian Research Institute of Food Additives –  
a branch of the Federal Scientific Center  
for Food Systems named after V.M. Gorbatov,  
Russian Academy of Science,  
55, Liteiny Ave., Saint Petersburg, 191014,  
Russian Federation,  
natalya\_sharova1@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4208-9299>

### Contribution of the authors

Daria D. Belova – conceptualization,  
investigation, writing – original draft.  
Natalya Yu. Sharova – supervision, editing.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests  
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved  
by all the co-authors.*

### Information about the article

*The article was submitted 02.12.2024.  
Approved after reviewing 17.03.2025.  
Accepted for publication 06.11.2025.*